

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
Mueller et al.

Examiner: Unknown

Group Art Unit: Unknown

Application No.: **To Be Assigned**

Filed: **Herewith**

Title: **The Use of *Saccharomyces cerevisiae* erg4
Mutants For Expressing Mammalian
Glucose Transporters**

CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR 1.8a)

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail, Express Mail Label No. EL721891987US in an envelope addressed to Mail Stop Patent Application, Commissioner of Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on

Date of Deposit

Sept. 10, 2003

Debra Coughlin
(Type or print name of person mailing paper)

Debra Coughlin
(Signature of person mailing paper)

Mail Stop Patent Application
Commissioner of Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION AND REQUEST FOR ENTRY OF PRIORITY PAPERS 37 C.F.R. § 1.55(a)

Dear Sir:

Applicants submit herewith certified copies of application, DE 10242763.1, filed on September 14, 2002, for which priority is claimed in the above-identified application.

This submission and request for entry is being made to satisfy the requirements under 35 U.S.C. § 119. Please note that no fees are associated with the entry of the priority documents since they are being timely submitted prior to the date the issue fee is due.

Respectfully submitted,

William C. Coppola, Reg. No. 41,686

Aventis Pharmaceuticals Inc.
Patent Department
Route #202-206 / P.O. Box 6800
Bridgewater, New Jersey 08807-0800
Telephone (908) 231-3800
Telefax (908) 231-2626

Aventis Docket No. DEAV2002/0065USNP



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 42 763.1

Anmeldetag: 14. September 2002

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae*
erg4-Mutanten zur Expression von Glukose-
transportern aus Säugetieren

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

5 Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* *erg4*-Mutanten zur Expression von Glukosetransportern aus Säugetieren.

Die Erfindung betrifft Hefestämme, in denen der humane Glut 4 und Glut 1 Transporter funktionell zur Expression gebracht werden kann.

- 10 Die meisten heterotrophen Zellen transportieren Glukose über spezielle Transporterproteine ins Zellinnere. Bei den verschiedenen Organismen haben sich unterschiedliche Mechanismen herausgebildet, die den Glukosetransport vermitteln, wie insbesondere Protonen-Symportsysteme, Na^+ -Glukosetransporter, bindungsproteinabhängige Systeme, Phosphotransferasesysteme sowie Systeme
- 15 für die erleichterte Diffusion. Bei den Eukaryoten vermittelt eine Familie von Glukosetransportern, die bei Säugetieren von den *GLUT*-Genen (*GLUT* = Glucosetransporter) und bei *Saccharomyces cerevisiae* von den *HXT*-Genen (*HXT* = Hexosetransporter) codiert werden, die Glukoseaufnahme über erleichterte Diffusion. Diese Transporter zählen zu einer größeren Familie von
- 20 Zuckertransportern. Sie sind durch das Vorliegen von 12 transmembranen Helices und durch mehrere konservierte Aminosäurereste gekennzeichnet. Der Glukosetransport spielt bei Krankheiten, die mit einer defekten Glukosehomöostase assoziiert sind, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder Fanconi-Bickel-Syndrom, eine große Rolle. Der Glukosetransport bei Säugetieren
- 25 war deshalb Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind dreizehn Glukosetransporter-ähnliche Proteine (*GLUT1* bis *GLUT12*, *HMIT* – H-myo-Inositol-Transporter)) identifiziert worden. Zu den Schlüsselrollen dieser Transporter zählen die Aufnahme von Glukose in verschiedene Gewebe, ihre Speicherung in der Leber, ihre insulinabhängige Aufnahme in die Muskelzellen und
- 30 Adipozyten sowie die Glukose-Messung durch die β -Zellen des Pankreas. *GLUT1* vermittelt den Glukosetransport in die Erythrozyten und durch die Blut-Hirn-Schranke, wird jedoch auch in vielen anderen Geweben exprimiert, während *GLUT4* auf insulinabhängige Gewebe, in erster Linie auf Muskel- und Fettgewebe

beschränkt ist. Bei diesen insulinabhängigen Geweben stellt die Kontrolle des Targetings von GLUT4-Transportern in intrazelluläre Kompartimente oder Plasmamembrankompartimente einen wichtigen Mechanismus für die Regulierung der Glukoseaufnahme dar. In Gegenwart von Insulin wird intrazelluläres GLUT4 auf die Plasmamembran zurückverteilt, um die Glukoseaufnahme zu erleichtern. GLUT1 wird in diesen insulinabhängigen Geweben ebenfalls exprimiert, und seine Verteilung in der Zelle wird ebenfalls von Insulin beeinflusst, jedoch weniger stark. Darüber hinaus wird die relative Wirksamkeit, mit der GLUT1 oder GLUT4 den Zuckertransport katalysieren, nicht nur von dem Ausmaß des Targetings jedes Transporters an die Zelloberfläche bestimmt, sondern auch von ihren kinetischen Eigenschaften.

Die Tatsache, dass unterschiedliche Glukosetransporter-Isoformen koexprimiert werden sowie der rasche Glukosemetabolismus hat Untersuchungen bezüglich der Rolle und der genauen Eigenschaften jeder Glukosetransporter-Isoform in diesen insulinabhängigen Geweben kompliziert gestaltet. Um diese Probleme zu lösen, wurden heterologe Expressionssysteme wie *Xenopus*-Oozyten, Gewebekulturzellen, Insektenzellen und Hefezellen verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Reihe von Schwierigkeiten bei diesen Systemen auftraten: zu schwache Aktivität der heterolog exprimierten Transporter, eigene Glukosetransporter bei diesen Systemen, die intrazelluläre Retention eines beträchtlichen Teils der Transporter, oder sogar die Produktion inaktiver Transporter.

Natürlich vorkommendes GLUT4 Protein von Säugetieren insbesondere dasjenige des Menschen kann in Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* unter bestimmten Bedingungen in funktioneller Weise zur Expression gebracht werden. Hefezellen sind einzellige eukaryotische Organismen. Sie eignen sich deshalb für manche Proteine besser zur Expression als bakterielle Systeme, insbesondere im Hinblick auf die Durchführung von Screeningassays zur Identifizierung von pharmazeutisch aktiven Substanzen.

Vorliegende Erfindung betrifft ein gereinigtes und isoliertes Polynukleotid umfassend eine DNA Sequenz, welche für das GLUT4V85M Protein codiert.

Dieses Protein enthält an Position 85 der Aminosäurekette des humanen GLUT4 Proteins einen Aminosäureaustausch von Valin nach Methionin. Dieses veränderte GLUT4V85M Protein eröffnet weitere Alternativen zur Expression eines funktionellen GLUT4 Proteins. Ein GLUT4 Protein soll in Zusammenhang mit *Saccharomyces cerevisiae* als funktionell angesehen werden, wenn in einem Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, dessen sämtliche Glukosetransporter inaktiv sind (=hxt(-)) nach Expression dieses GLUT4 Proteins eine Glukoseaufnahme zu beobachten ist. Die Glukoseaufnahme kann entweder durch Transportmessungen mittels radioaktiv markierter Glukose oder durch Wachstum auf Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle festgestellt werden.

Das gereinigte und isolierte Polynukleotid umfassend eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein GLUT4V85M kodiert, kann in einer bevorzugten Ausführungsform eine Sequenz der folgenden Gruppen umfassen oder aus ihr bestehen:

- a) eine Nukleotidsequenz, gemäß Seq ID Nr. 1,
- b) eine Nukleotidsequenz, welche unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz der Seq ID Nr.1 hybridisiert und die für ein Protein GLUT4V85M kodiert.

Das gereinigte und isolierte Polynukleotid kodiert bevorzugt ein GLUT4V85M Protein, welches eine Aminosäuresequenz der Seq ID Nr. 2 aufweist.

Das gereinigte und isolierte Polynukleotid umfassend eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein GLUT4V85M wie vorstehend beschrieben kodiert, kann in operativer Weise mit einem Promotor verbunden sein. Als Promotor kommen insbesondere prokaryotische oder eukaryotische Promotoren wie beispielsweise der Lac-, trp-, ADH- oder HXT7-Promotor in Frage. Der für das Protein GLUT4V85M kodierende Teil des Polynukleotids ist genau dann in operativer Weise mit einem Promotor verbunden, wenn mittels dieses Promotors unter Zuhilfenahme eines Vektors in einem bakteriellen oder eukaryotischen Organismus eine mRNA gebildet wird, welche in das Protein GLUT4V85M translatiert werden kann. Ein solcher Vektor ist beispielsweise der Vektor p4H7GLUT4V85M (Seq ID Nr. 3). Das Protein GLUT4V85M kann mittels diesen Vektors in Hefezellen exprimiert werden.

Vorstehend beschriebenes Polynukleotid umfassend eine DNA Sequenz, welche für ein Protein GLUT4V85M kodiert, eignet sich in einer bevorzugten Ausführungsform zur Replikation dieses Polynukleotids in einer Hefezelle oder zur Ausprägung des für

das Protein GLUT4V85M kodierenden Teils des Polynukleotides in das Protein GLUT 4 V85M in einer Hefezelle. Als Hefezelle eignet sich insbesondere *Saccharomyces cerevisiae*. Zur Replikation und Expression in einer Hefezelle liegt das Polynukleotid umfassend eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein

5 GLUT4V85M kodiert, als Hefevektor vor. Der für das Protein GLUT4V85M kodierende Bereich des Polynukleotids kann in operativer Weise mit einem für Hefezellen spezifischen Promotor wie beispielsweise dem ADH-Promotor (Alkohol-Dehydrogenase-Promotor) oder HXT7-Promotor (Hexosetransporter-Promotor) verbunden sein. Bei den Hefevektoren handelt es sich um eine Gruppe von

10 Vektoren, die zur Klonierung von DNA in Hefen entwickelt wurde.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Hefezelle aus *Saccharomyces cerevisiae*, in welcher sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind (=hxt (-)) und in welcher kein funktionelles Erg4 Protein enthalten ist. Bei einer solchen Hefezelle

15 handelt es sich bevorzugt um eine wie bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 16, 38124 Braunschweig) als *Saccharomyces cerevisiae* DSM 15187 hinterlegte Hefezelle.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Hefezelle, in der sämtliche

20 Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind und in der kein funktionelles Fgy1 Protein und kein funktionelles Erg4 Protein enthalten ist. Das Fehlen eines Erg4 Proteins oder eines Fgy1 Proteins kann insbesondere auf eine Unterbrechung der betreffenden kodierenden Genomabschnitte oder auf teilweise oder vollständige Entfernung der kodierenden Genomabschnitte zurückzuführen sein.

25 Als Hefezelle, welche keine funktionellen Glukosetransporter, kein funktionelles Fgy1 Protein und kein funktionelles Erg4 Protein enthält, wird bevorzugt eine wie bei der DSMZ als *Saccharomyces cerevisiae* DSM 15184 hinterlegte Hefezelle verwendet. Eine wie vorstehend beschriebene Hefezelle wird bevorzugt zur Ausprägung (=Expression) eines GLUT1 Proteins oder eines GLUT4 Proteins eines Säugetieres,

30 wie insbesondere von Ratte, Maus, Kaninchen, Schwein, Rind oder Menschenaffen verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Hefezelle zur Ausprägung eines menschlichen GLUT4 oder GLUT1 Proteins verwendet. Eine Hefezelle aus *Saccharomyces cerevisiae* deren sämtliche Glukosetransporter sowie das Erg4 Protein nicht mehr funktionell sind, kann ein Polynukleotid dieser

Erfindung enthalten, welches eine DNA-Sequenz umfasst, welche für ein Protein GLUT4V85M kodiert. Diese Hefezelle kann das Protein GLUT4V85M auch zur Expression bringen und damit dieses Protein enthalten.

Ein solcher Hefestamm enthaltend ein Polynukleotid, welches eine DNA-Sequenz kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst, ist bevorzugt der bei der DSMZ hinterlegte Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* DSM 15185.

Eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter sowie das Erg4 Protein nicht mehr funktionell sind, welche ein Polynukleotid umfassend eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein GLUT4V85M kodiert, enthält, kann beispielsweise hergestellt werden, indem

- a) eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter sowie das Erg4 Protein nicht mehr funktionell sind, bereitgestellt wird,
- b) ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, welches eine DNA-Sequenz kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst und in einer Hefezelle repliziert werden kann, bereitgestellt wird,
- c) die Hefezelle aus a) mit dem Polynukleotid aus b) transformiert wird,
- d) eine transformierte Hefezelle selektiert wird,
- e) gegebenenfalls das Protein GLUT4V85M zur Expression gebracht wird.

Ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, welches eine DNA-Sequenz kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst, ist bevorzugt ein in einer Hefezelle replizierbarer Vektor, in welchem die DNA-Sequenz kloniert wurde. Ein solcher Vektor ist beispielsweise p4H7GLUT4V85M (Seq ID Nr. 3).

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter sowie deren Proteine für Fgy1 und Erg4 nicht mehr funktionell sind und die ein Polynukleotid enthält, welches eine DNA-Sequenz kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst. Diese Hefezelle kann das Protein GLUT4V85M auch zur Expression bringen und damit dieses Protein enthalten. Ein solcher Hefestamm ist bevorzugt der bei der DSMZ hinterlegte Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* DSM 15186.

Eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter sowie die Proteine Fgy1 sowie Erg4 nicht mehr funktionell sind und die ein Polynukleotid umfassend eine DNA-

Sequenz, welche für das Protein GLUT4V85M kodiert, enthält, kann beispielsweise hergestellt werden, indem

- a) eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter sowie die Proteine Fgy1 sowie Erg4 nicht mehr funktionell sind, bereitgestellt wird,
- 5 b) ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, welches eine DNA-Sequenz kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst und in einer Hefezelle repliziert werden kann, bereitgestellt wird,
- c) die Hefezelle aus a) mit dem Polynukleotid aus b) transformiert wird,
- d) eine transformierte Hefezelle selektiert wird,
- 10 e) gegebenenfalls das Protein GLUT4V85M zur Expression gebracht wird.

Das vorstehend genannte isolierte und gereinigte Polynukleotid, welches eine DNA-Sequenz kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst, ist bevorzugt ein in einer Hefezelle replizierbarer Vektor, in welchem die DNA-Sequenz kloniert wurde. Ein
15 solcher Vektor ist beispielsweise p4H7GLUT4V85M (Seq ID Nr. 3).

Die Erfindung betrifft auch eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind, welche ein Polynukleotid umfassend eine DNA-Sequenz, die für das Protein GLUT4V85M kodiert, enthält.

- 20 Diese Hefezelle kann das Protein GLUT4V85M auch zur Expression bringen und damit dieses Protein enthalten. Ein solcher Hefestamm ist bevorzugt der bei der DSMZ hinterlegte Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* 15188.

Eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind und
25 die ein Polynukleotid umfassend eine DNA-Sequenz, die für das Protein GLUT4V85M kodiert, enthält, kann beispielsweise hergestellt werden, indem

- a) eine Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind, bereitgestellt wird,
- b) ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, welches eine DNA-Sequenz
30 kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst und in einer Hefezelle repliziert werden kann, bereitgestellt wird,
- c) die Hefezelle aus a) mit dem Polynukleotid aus b) transformiert wird,
- d) eine transformierte Hefezelle selektiert,
- e) gegebenenfalls das Protein GLUT4V85M zur Expression gebracht wird.

Bei dem vorstehend genannten isolierten und gereinigten Polynukleotid, welches eine DNA-Sequenz kodierend für das Protein GLUT4V85M umfasst, handelt es sich bevorzugt um einen in einer Hefezelle replizierbaren Vektor, in welchem die DNA-

5 Sequenz kloniert wurde. Ein solcher Vektor ist beispielsweise p4H7GLUT4V85M (Seq ID Nr. 3).

Die Erfindung betrifft auch ein Protein der Aminosäuresequenz gemäß Seq ID Nr. 2. Dieses Protein ist ein humanes GLUT4 Protein, in welchem an Position 85 der Aminosäurekette ein Valin durch ein Methionin ausgetauscht ist.

10

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Aktivität eines GLUT4 Proteins stimuliert, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle bereitgestellt wird, deren sämtliche Glukosetransporter sowie das Erg4 Protein nicht mehr funktionell sind, und die ein Polynukleotid
- 15 umfassend eine DNA-Sequenz, die für ein Protein GLUT4V85M kodiert, enthält,
- b) eine chemische Verbindung bereitgestellt wird,
- c) die Hefe aus a) mit der chemischen Verbindung aus b) in Kontakt gebracht wird,
- 20 d) die Glukoseaufnahme der Hefe aus c) festgestellt wird,
- e) der festgestellte Wert der Glukoseaufnahme aus d) in Beziehung gesetzt wird zum festgestellten Wert der Glukoseaufnahme in einer Hefezelle gemäß a), welche nicht mit einer chemischen Verbindung gemäß b) in Kontakt gebracht wurde, wobei eine Verbindung, die eine Vergrößerung der aufgenommenen
- 25 Glukosemenge in der Hefe gemäß d) bewirkt, die Aktivität des GLUT4V85M Proteins stimuliert. Von Verbindungen, welche die Aktivität GLUT4V85M Proteins stimuliert, ist anzunehmen, dass sie auch die Aktivität von GLUT4 stimulieren.

- 30 Die Erfindung betrifft auch ein Arzneimittel, welches eine Verbindung, die durch vorstehend beschriebenes Verfahren identifiziert wurde, enthält sowie weiterhin Zusatz- und Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung einer Verbindung, die durch vorstehend beschriebenes

Verfahren identifiziert wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes Typ I und/oder II.

Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch vorstehend beschriebenes Verfahren identifiziert wurde, sowie Zusatz- und Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung einer Verbindung, welche durch vorstehend beschriebenes Verfahren identifiziert wurde zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung einer Verbindung, welche durch ein vorstehend beschriebenes Verfahren identifiziert wurde zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes.

Vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche das Protein, das durch das Erg4 Gen kodiert ist, inhibiert, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle bereitgestellt wird, deren sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind und die ein Polynukleotid enthält, welches eine DNA-Sequenz umfasst, die für das Protein GLUT4V85M kodiert und in einer Hefezelle repliziert werden kann,
- b) eine chemische Verbindung bereitgestellt wird,
- c) die Hefe aus a) mit der chemischen Verbindung aus b) in Kontakt gebracht wird,
- d) die Glukoseaufnahme der Hefe aus c) festgestellt wird,
- e) der festgestellte Wert der Glukoseaufnahme aus d) in Beziehung gesetzt wird zum festgestellten Wert der Glukoseaufnahme in einer Hefezelle gemäß a), welche nicht mit einer chemischen Verbindung gemäß b) in Kontakt gebracht wurde, wobei eine Verbindung, die eine Erhöhung der aufgenommenen Menge an Glukose in der Hefe gemäß d) bewirkt, die Aktivität des Proteins Erg4 inhibiert.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche das korrespondierende Protein des FGY1 Gens inhibiert, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle bereitgestellt wird, deren sämtliche Glukosetransporter und deren Erg4 Protein nicht mehr funktionell sind und welche ein GLUT4 Protein enthält, bereitgestellt wird,
 - b) eine chemische Verbindung bereitgestellt wird,
 - 5 c) die Hefe aus a) mit der chemischen Verbindung aus b) in Kontakt gebracht wird,
 - d) die Glukoseaufnahme der Hefe aus c) festgestellt wird,
 - e) der festgestellte Wert der Glukoseaufnahme aus d) in Beziehung gesetzt wird zum festgestellten Wert der Glukoseaufnahme in einer Hefezelle gemäß a),
 - 10 welche nicht mit einer chemischen Verbindung gemäß b) in Kontakt gebracht wurde, wobei eine Verbindung, die eine Erhöhung der aufgenommenen Menge an Glukose in der Hefe gemäß d) bewirkt, die Aktivität des Proteins Fgy1 inhibiert.
- 15 Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch das vorstehend beschriebene Verfahren identifiziert wurde, sowie Zusatz- und Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels.

Die Erfindung wird im folgenden bezüglich technischer Einzelheiten näher erörtert.

20

Hybridisierung bedeutet die Zusammenlagerung zweier Nukleinsäure-Einzelstränge, die komplementäre Basensequenzen besitzen, zu Doppelsträngen. Hybridisierung kann zwischen zwei DNA-Strängen, einem DNA- und einem RNA-Strang sowie zwischen zwei RNA-Strängen erfolgen. Grundsätzlich lassen sich Hybridmoleküle

25 herstellen, indem man die beteiligten Nukleinsäuren, die zunächst doppelsträngig vorliegen können, soweit erhitzt, dass sie in einzelsträngige Moleküle ohne Sekundärstruktur zerfallen. Dies geschieht beispielsweise durch Kochen im Wasserbad für 10 Minuten. Anschließend lässt man sie langsam abkühlen. Während der Abkühlphase erfolgt die Paarung komplementärer Ketten zu doppelsträngigen

30 Hybridmolekülen. Hybridisierungen werden unter Laborbedingungen gewöhnlich unter Zuhilfenahme von Hybridisierungsfiltern durchgeführt, auf welchen einzelsträngige oder denaturierbare Polynukleotidmoleküle durch Blotten oder Elektrophorese aufgebracht werden. Die Hybridisierung kann mit entsprechenden komplementären Polynukleotidmolekülen sichtbar gemacht werden, indem man

diese zu hybridisierenden Polynukleotidmoleküle mit einer radioaktiven fluoreszierenden Markierung versieht. Stringenz beschreibt den Grad der Übereinstimmung oder Passgenauigkeit bestimmter Bedingungen. Bei hoher Stringenz sind die Anforderungen an die Übereinstimmung höher als bei niedriger Stringenz. Bei der Hybridisierung von Nukleinsäuren werden je nach Anwendung und Zielsetzung bestimmte, unterschiedlich stringente Bedingungen eingestellt. Bei hoher Stringenz sind die Reaktionsbedingungen bei der Hybridisierung so eingestellt, dass nur sehr gut zueinander passende, komplementäre Moleküle miteinander hybridisieren können. Niedere Stringenz ermöglicht auch eine partielle Hybridisierung von Molekülen mit mehr oder weniger großen Abschnitten ungepaarter bzw. fehlgepaarter Basen.

Die Hybridisierungsbedingungen sollten als stringent insbesondere dann verstanden werden, wenn die Hybridisierung in einer wässrigen 2x SSC enthaltenden Lösung bei 68°C für mindestens 2 Stunden erfolgt und anschließend zuerst für 5 Minuten in 2x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur, dann 1 Stunde in 1x SSC/0,1 % SDS bei 68 °C und für 1 weitere Stunde in 0,2 % SSC/0,1 % SDS bei 68°C gewaschen wird.

Eine 2x SSC-, 1x SSC bzw. 0,2x SSC-Lösung wird durch entsprechende Verdünnung einer 20x SSC-Lösung hergestellt. Eine 20x SSC-Lösung enthält 3 mol/l NaCl und 0,3 mol/l Na-Citrat. Der pH-Wert beträgt 7,0. Dem Fachmann sind die Methoden für Hybridisierungen von Polynukleotiden unter stringenten Bedingungen vertraut. Er findet entsprechende Anleitungen in Fachbüchern wie insbesondere den Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience; Herausgeber: Frederick M. Ausubel, Roger Brant, Robert E. Kingston, David J. Moore, J. G. Seidmann, Kevin Struhl; ISBN: 0-471-50338-X).

Bei den Hefevektoren können verschiedene Untergruppen unterschieden werden. Ylp-Vektoren (Yeast integrating plasmids) entsprechen im wesentlichen dem für Klonierungen in Bakterien eingesetzten Vektoren, enthalten aber ein selektierbares Hefe-Gen (z. B. URA3, LEU2).

Nur wenn es nach Einführung dieses Vektors zur Integration der Fremd-DNA in einem Hefe-Chromosom kommt, werden diese Sequenzen zusammen mit dem

Chromosom repliziert und bei der Entstehung eines Klon an alle Tochterzellen stabil weitergegeben.

Von diesem Verfahren ausgehend sind Plasmide abgeleitet, die sich aufgrund von eukaryotischen ORIs (origin of replication) autonom replizieren können. Solche

- 5 Hefevektoren werden YRp-Vektoren (Yeast replicating plasmids) oder ARS-Vektoren (autonomously replicating sequence) genannt. Weiterhin gibt es YE_p-Vektoren (Yeast episomal plasmids), die sich von 2 μ m-Hefepiasmid ableiten und ein selektierbares Markergen enthalten. Die Klasse der YAC-Vektoren (Yeast artificial chromosome) verhält sich wie eigenständige Chromosomen.

10

Ein Hefevektor enthaltend ein Gen zur Expression wird, damit es zur Expression gebracht werden kann, durch Transformation in die Hefe eingeführt. Dazu eignen sich beispielsweise Methoden wie die Elektroporation oder die Inkubation kompetenter Zellen durch Vektor-DNA. Geeignete Expressionspromotoren der Hefe

- 15 sind dem Fachmann bekannt. Solche sind beispielsweise der SOD1-Promotor (Superoxiddismutase), ADH-Promotor (Alkoholdehydrogenase), der Promotor für das Gen der sauren Phosphatase, HXT2-Promotor (Glukosetransporter 2), HXT7-Promotor (Glukosetransporter 7), GAL2-Promotor (Galaktosetransporter) und andere. Das Konstrukt bestehend aus einem Expressionspromotor einer Hefe und
- 20 einem Gen zur Expression (z. B. GLUT4V85M) ist für den Zweck der Expression Bestandteil eines Hefevektors. Dieser Hefevektor kann zur Durchführung der Expression als selbstreplizierendes Partikel unabhängig vom Genom der Hefe vorliegen oder stabil in das Genom der Hefe integriert sein. Als Hefevektor eignet sich grundsätzlich jede Polynukleotidsequenz, welche in einer Hefe vermehrt werden

- 25 kann. Als Hefevektoren können insbesondere Hefepasmide oder künstliche Hefechromosomen (Yeast Artificial Chromosomes) verwendet werden. Hefevektoren enthalten in der Regel einen „origin of replication“ (2 μ , ars) für die Einleitung der Replikation sowie einen Selektionsmarker, der üblicherweise aus einem Auxotrophiemarker oder einem Antibiotikumresistenzgen besteht. Einem Fachmann
- 30 als Hefevektoren bekannt sind beispielsweise pBM272, pCS19, pEMBCYe23, pFL26, pG6, pNN414, pTV3, p426MET25, p4H7 oder andere.

Die Selektion einer Zelle im Sinne dieser Erfindung soll deren gezielte Anreicherung aufgrund eines Selektionsmarkers wie beispielsweise der Resistenz gegen ein Antibiotikum oder dem Wachstumsvermögen auf einem bestimmtem Minimalmedium, sowie weiterhin deren Isolierung und anschließende Anzucht auf einer Agarplatte oder in Submerskultur verstanden werden.

Für den Fachmann gehören Anzucht, Transformation und Selektion einer transformierten Hefezelle sowie Expression eines Proteins in einer Hefezelle zu üblicherweise verwendeten Methoden. Er findet Anleitungen hierzu in

- 10 Standardlehrbüchern wie beispielsweise in „Walker Graeme M.: Yeast Physiology and Biotechnology, Wiley and Sons, ISBN: 0-471-9446-8“ oder in „Protein Synthesis and Targeting in Yeast, Ed. Alistair J. P. Brown, Mick F. Frute and John E. G. McCarty; Springer Berlin; ISBN: 3-540-56521-3 oder in “Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold
15 Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0”.

- Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 17 Hexosetransporter und zusätzlich drei Maltosetransporter bekannt, die, sofern sie stark genug exprimiert werden, in der Lage sind, Hexosen in die Hefe zu transportieren. Bekannt ist ein Stamm, dem
20 durch Deletion sämtliche Transporter, die zur Hexoseaufnahme geeignet sind, entfernt wurden. Dieser Stamm enthält lediglich noch die beiden Gene MPH2 und MPH3, die zu Maltosetransportproteinen homolog sind. Die beiden Gene MPH2 und MPH3 werden bei Anwesenheit von Glukose im Medium reprimiert. Herstellung und Charakterisierung dieses Hefestammes ist in Wieczorke et al, FEBS Lett. 464, 123 –
25 128 (1999) beschrieben. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, sich auf einem Substrat mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Aus diesem Stamm können Mutanten selektiert werden, die ausgehend von einem entsprechenden Vektor GLUT1 funktionell exprimieren (Stamm hxt fgy1-1).

- Transformiert man in den Hefestamm hxt fgy1-1 einen Plasmidvektor, welcher ein
30 GLUT4-Gen unter Kontrolle eines Hefepromotors trägt, wird dennoch nur sehr wenig Glukose transportiert. Die funktionelle Expression von GLUT4 erfordert weitere Anpassungen dieses Hefestammes, um einen signifikanten Glukosetransport mittels GLUT4 zu ermöglichen. Solche Hefestämme, die Glukose mittels eines einzigen

Glukosetransporters GLUT4 in Zellen aufnehmen, lassen sich auf Substraten mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle isolieren. Dazu wird ein Hefestamm hxt fgy1-1, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, transformiert. Diese so transformierten Hefezellen werden auf einem

- 5 Nährmedium ausgebracht, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält, und werden darauf inkubiert. Nach einigen Tagen der Inkubation bei beispielsweise 30 °C beobachtet man Wachstum von einzelnen Kolonien. Eine dieser Kolonien wird isoliert. Entfernt man aus dieser Kolonie das Hefeplasmid, unterbleibt die Vermehrung auf dem Nährmedium mit Glukose als einzige Kohlenstoffquelle. Wird
- 10 diesem Stamm, der nun kein Vektorplasmid mehr enthält, wiederum ein Hefevektor, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, durch Transformation zugeführt, dann ist dieser Stamm wiederum in der Lage, sich auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren.

- 15 Vorstehend genannte Hefestämme sind Gegenstand der internationalen Anmeldung PCT/EP02/01373 mit Tag der Anmeldung vom 9. Februar 2002, welche die Priorität der DE 10106718.6 vom 14. Februar 2002, in Anspruch nimmt.

- 20 Hefestämme deren sämtliche eigene Transporter für Hexosen (Glukosetransporter) nicht mehr funktionell sind, werden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bereits in Zusammenhang mit der internationalen Anmeldung PCT/EP02/01373 zu einem früheren Zeitpunkt unter der Nummer DSM 14035, DSM 14036 oder DSM 14037 hinterlegt.

- 25 Die Polynukleotid – und Aminosäuresequenzen für GLUT4 sind zugänglich beispielsweise über folgende Einträge in Genbank: M20747 (cDNA; Mensch), EMBL: D28561 (cDNA; Ratte), EMBL: M23382 (cDNA; Maus), Swissprot: P14672 (Protein; Mensch), Swissprot: P19357 (Protein; Ratte) und Swissprot: P14142 (Protein; Maus).

30

Polynukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen für GLUT1 sind offenbart unter den folgenden Code-Nummern der angegebenen Datenbanken: EMBL: M20653 (cDNA; Mensch), EMBL: M13979 (cDNA; Ratte), EMBL: M23384 (cDNA; Maus),

Swissprot: P11166 (Protein; Mensch), Swissprot: P11167 (Protein; Ratte) und Swissprot: P17809 (Protein; Maus).

Arzneimittel sind Darreichungsformen pharmakologisch aktiver Substanzen zur
 5 Therapie von Krankheiten oder körperlicher Fehlfunktionen bei Mensch und Tier. Für die orale Therapie kennt man beispielsweise Pulver, Granulate, Tabletten Pillen, Pastillen, Dragees, Kapseln, flüssige Extrakte, Tinkturen, Sirup. Für eine äußerliche Anwendung verwendet man beispielsweise Aerosole, Sprays, Gele, Salben oder Puder. Eine parenterale Anwendung ist möglich mit Injektions- oder
 10 Infusionslösungen mit Ampullen, Flaschen oder Spritzampullen. Dem Fachmann der pharmazeutischen Technologie (Galenik) sind diese und andere Arzneimittel bekannt.

Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels ermöglichen die Zubereitung der
 15 wirksamen Substanz mit dem Ziel, eine auf die jeweilige Anwendung optimal abgestimmte Ausbringung, Verteilung und Entfaltung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Füll-, Binde-, Spreng-, oder Gleitmittel wie Lactose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Cellulose, Stärke, Dicalciumphosphat, Polyglykole, Alginate, Polyvinylpyrrolidon,
 20 Carboxymethylcellulose, Talkum oder Siliciumdioxid.

Diabetes oder Zuckerkrankheit äußert sich durch Ausscheidung von Glukose mit dem Harn bei krankhafter Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglycämie)
 aufgrund einer chronischen Stoffwechselstörung, die auf Mangel an Insulin oder
 25 herabgesetzter Insulinwirkung beruht. Die fehlende oder reduzierte Insulinwirkung führt zu mangelhafter Resorption und Verwertung der ins Blut aufgenommenen Glukose durch die Körperzellen. Im Fettgewebe kommt es unter der Einwirkung Insulin-antagonistischer Hormone zu gesteigerten Lipolyse mit Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut.

30

Bei der Fettleibigkeit (Adipositas, Obesitas) handelt es sich um abnorme Gewichtszunahme aufgrund einer gestörten Energiebilanz durch übermäßige Kalorienaufnahme, die ein Gesundheitsrisiko beinhaltet.

Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschriebenen bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann mittels Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glukose erfolgen. Dazu wird eine bestimmte Menge der Hefezellen beispielsweise eine Menge von 60 mg

- 5 Nassgewicht pro ml in beispielsweise 100 μ l eines Puffers suspendiert und mit einer definierten Menge von ^{14}C - oder ^3H - markierter Glukose als einzige Kohlenstoffquelle versetzt. Man inkubiert die Zellen und entnimmt zu bestimmten Zeiten definierte Mengen der Zellen. Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Glukose erfolgt mit Hilfe von LSC (Liquid Scintillation Counting = Flüssig-
- 10 Szintillationszählung). Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschriebenen bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann aber auch mittels Wachstumstest auf Medien mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle erfolgen. Dazu bestimmt man die Wachstumsrate des Stammes nach Zugabe der Verbindung beispielsweise durch regelmäßige Messungen der
- 15 optischen Dichte der Kultur bei 600 nm und vergleicht diesen Wert mit der Wachstumsrate eines Kontrollstammes (z. B. Wildtyphefestamm).

Die Bereitstellung einer Verbindung erfolgt insbesondere durch chemische Synthese oder Isolierung chemischer Stoffe aus biologischen Organismen. Die chemische

20 Synthese kann auch automatisiert erfolgen. Die durch Synthese oder Isolierung gewonnenen Verbindungen können in einem geeigneten Lösungsmittel in Lösung gebracht werden. Geeignete Lösungsmittel sind insbesondere wässrige Lösungen, welche einen bestimmten Anteil eines organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten.

25

Das In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe mit einer Verbindung zur Identifizierung einer Verbindung im Sinne einer vorstehend genannten Erfindung, erfolgt insbesondere in dafür vorgesehenen Vorrichtungen eines Laborroboters. Solche Vorrichtungen können aus speziell präparierten Kammern mit Vertiefungen,

30 aus Mikrotiterplatten, Eppendorfgefäßen oder Laborgläsern bestehen. Laborroboter sind in aller Regel auf hohe Durchsatzraten konzipiert. Ein Verfahren wie das vorstehend genannte ausgeführt mit Hilfe eines Laborroboters wird deshalb auch HTS (High Throughput Screening) genannt.

Die Seq ID Nr. 1 offenbart eine Polynucleotidsequenz umfassend den codierenden bereich des Proteins GLUT4V85M. Die Seq ID Nr. 2 offenbart die Aminosäuresequenz des Proteins GLUT4V85M. Die Seq ID Nr. 3 offenbart die Polynucleotidsequenz des Vektors p4H7GLUT4V85M.

5

Beispiele

Verwendung der Hefestämme

- 10 Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Hefestämme stammten vom Stamm CEN-PK2-1C (*MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2*) ab. Die Herstellung eines Hefestammes mit Deletionen in den Hexose-Transportergenen (HXT) wurde von Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 – 128 (1999) beschrieben: EBY-18ga (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1*
- 15 *MAL2-8^c SUC2*), EBY.VW4000 (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δmph2 Δmph3 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2*). Die Medien beruhten auf 1 % Hefeextrakt und 2 % Pepton (YP), während die Minimalmedien aus 0,67 % Difco-Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (YNB) bestanden und Zusätze für Auxotrophiebedürfnisse sowie unterschiedliche Kohlenstoffquellen enthielten. Die
- 20 Hefezellen wurden unter aerobischen Bedingungen bei 30°C auf einem Rundschüttler oder auf Agarplatten gezüchtet. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) oder Bestimmung des Durchmessers der Hefekolonien verfolgt.

25

Bestimmung der Glukoseaufnahme

- Der Glukosetransport wurde als Aufnahme von D-[U-¹⁴C]-Glukose (Amersham) gemessen und die Kinetikparameter wurden aus Eadie-Hofstee-Graphiken bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und
- 30 wieder in Phosphatpuffer in einer Konzentration von 60 mg (Nassgewicht) pro ml suspendiert. Die Glukoseaufnahme wurde bei Glukosekonzentrationen zwischen 0,2 und 100 mM bestimmt, und die spezifische Aktivität des Substrats bewegte sich zwischen 0,1 und 55,5 kBq μmol^{-1} . Die Zellen und die Glukoselösungen wurden 5

Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Glukoseaufnahme wurde durch Versetzen der Zellen mit radioaktiver Glukose gestartet. Nachdem 5 Sekunden lang inkubiert worden war, versetzte man mit 10 ml eiskaltem Stopppuffer (0,1 M K_2PO_4 , pH 6,5, 500 mM Glukose) und die Zellen wurden rasch auf Glasfaserfiltern ($\varnothing = 24$ mm, Whatman) abgefiltert. Die Filter wurden dreimal rasch mit eiskaltem Puffer gewaschen und die eingebaute Radioaktivität wurde mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Die Hemmung durch Cytochalasin B (Endkonzentration 20 μM , gelöst in Ethanol) wurde in einem 15-Sekunden-Aufnahmetest mit 50 mM bzw. 100 mM radioaktiver Glukose gemessen, nachdem die Zelle 15 Minuten lang in Gegenwart des Hemmstoffs oder nur des Lösungsmittels inkubiert worden war.

Es wurde ein neues heterologes Expressionssystem für Glukosetransporter aus Säugetierzellen entwickelt. Dieses System basiert auf einem *S. cerevisiae*-Stamm, dem alle endogenen Glukosetransporter durch Zerstörung der kodierenden Gene entfernt wurden. Dieser Stamm ist nicht mehr in der Lage, Glukose über die Plasmamembran aufzunehmen und mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Um die heterologen Glukosetransporter des Menschen oder aus anderen Säugetieren, GLUT1 und GLUT4, in einer aktiven Form in die Plasmamembran der Hefe zu integrieren, mussten zusätzliche Mutationen in den Hefestamm eingefügt werden. GLUT1 ist nur in einem *fgy1-1* Mutantenstamm aktiv, GLUT4 nur in *fgy1-1 fgy4-X* Doppelmutanten.

Das *FGY1-Gen* konnte kloniert werden. Es handelt sich dabei um den *S. cerevisiae* ORF YMR212c. Aufgrund der Ergebnisse ergibt sich für die Funktion, dass entweder Fgy1 oder ein von Fgy1 erzeugtes Produkt die Aktivität menschlicher Glukosetransporter inhibiert oder an der Verschmelzung der GLUT-transportierenden Vesikel mit der Plasmamembran beteiligt ist.

Im Gegensatz zu GLUT1 und ähnlich zu Säugetierzellen ist ein großer Teil der GLUT4-Proteine in der Hefe in intrazellulären Strukturen lokalisiert. Es konnten insgesamt neun rezessive Mutanten isoliert werden (*fgy4-1 bis fgy4-9*), in denen

GLUT4 nun weiter zur Plasmamembran geleitet wird und bei gleichzeitiger *fgy1-1* Mutation dort aktiv wird.

Zur Komplementationsanalyse wurde die von Bruns et al. (Genes Dev. 1994; 8: 1087-105) beschriebene Insertions-Genbank eingesetzt. Der *hxt fgy1-1* Stamm wurde zunächst mit einem GLUT4-Plasmid und dann mit der mobilisierten Insertions-Genbank transformiert. Anschließend wurde nach Transformanten gesucht, die auf Glukosemedium wachsen konnten. Bei einer der untersuchten Mutanten stellte es sich heraus, dass das *ERG4-Gen* zerstört worden war. *ERG4* kodiert für ein Enzym (Oxidoreduktase) der Ergosterolbiosynthese. Dieses Enzym, die Sterol-C-24(28)-Reduktase katalysiert den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese und wandelt Ergosta-5,7,22,24,(28)-Tetraenol in das Endprodukt Ergosterol um. Das Erg4-Protein enthält vermutlich acht Transmembrandomänen und ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Eine *erg4*-Mutante ist lebensfähig, da der Einbau der Ergosterolvorstufen in die Membranen der Hefe den Verlust von Ergosterol kompensiert.

Der hemmende Einfluss von Erg4 auf die Funktionalität von GLUT4 wurde durch eine gezielte *erg4*-Deletion im *hxt fgy1-1* Stamm bestätigt. Der resultierende Stamm (*hxt fgy1-1 Δerg4*) wurde mit SDY022 bezeichnet.

Proteininteraktionstests mit Hilfe des „Split-Ubiquitin“-Systems ergaben, dass das menschliche GLUT4 direkt mit Erg4 der Hefe interagiert. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass das Erg4-Protein der Hefe im Endoplasmatischen Retikulum entweder direkt die weitere Translokation von GLUT4 verhindert oder dass es GLUT4 in irgendeiner Art und Weise modifiziert, die für die Translokation und/oder Funktion wichtig ist.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *ERG4* im *hxt*-Nullstamm alleine, also trotz funktionellem *FGY1*, zwar GLUT1 aktiv macht aber nicht GLUT4. Die Ergebnisse der Wachstumstests sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Um auszuschließen, dass Ergosterol selbst einen negativen Einfluss auf GLUT4 ausübt, wurden Wachstumstests auf Agarplatten mit Ergosterol unter anaeroben

Bedingungen durchgeführt. Alle mit GLUT4 transformierten Hefestämme konnten unter diesen Bedingungen nicht wachsen (Tab. 2). Auch die GLUT1-Transformanten im *hxt fgy1-1* Stamm zeigten im Gegensatz zu aerobem Wachstum unter anaeroben Bedingungen kein Wachstum auf Glukose. Nur nach der Deletion von *ERG4*

5 konnten GLUT1-Transformanten wachsen.

Der Austausch von Val85 in Met durch *in vitro* Mutagenese machte GLUT4 unabhängig von der *fgy1-1* Mutation und führte dazu, dass GLUT4V85M bereits in einem *hxt erg4* Stamm funktionell war. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass

10 Fgy1 direkt oder indirekt auf diese Position, die sich innerhalb der zweiten Transmembranhelix der GLUT-Transporter befindet, wirkt.

In Tabelle 3 findet sich die Beschreibung der in Zusammenhang mit dieser Patentanmeldung bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und

15 Zellkulturen (DSMZ) - Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschwei - hinterlegten Hefestämme.

Tabelle1: Wachstum von GLUT1- und GLUT4-Transformanten auf Glukosemedium

Genotyp	1 % Glukose		1 % Glukose	
$\Delta hxt fgy1-1$	GLUT4	-	GLUT1	++
$\Delta hxt fgy1-1 \Delta erg4$	GLUT4	++	GLUT1	++
$\Delta hxt fgy1-1 \Delta erg4$	Vektor	-	Vektor	-
$\Delta hxt fgy1-1 \Delta erg5$	GLUT4	-	GLUT1	++
$\Delta hxt fgy1-1 \Delta erg4 \Delta erg5$	GLUT4	+	GLUT1	++
$\Delta hxt \Delta erg4$	GLUT4	-	GLUT1	+
$\Delta hxt \Delta erg5$	GLUT4	-	GLUT1	-

20

25

Tabelle 2: Wachstum von GLUT1- und GLUT4-Transformanten auf Glukosemedium mit und ohne Ergosterol unter anaeroben Bedingungen

Genotyp		1 % Glukose	1 % Glukose+ 33 mg/l Ergosterol
<i>Δhxt fgy1-1</i>	GLUT1	-	-
	GLUT4	-	-
<i>Δhxt fgy1-1 Δerg4</i>	GLUT1	-	++
	GLUT4	-	-
<i>Δhxt fgy1-1 Δerg5</i>	GLUT1	-	-
	GLUT4	-	-
<i>Δhxt fgy1-1 Δerg4 Δerg5</i>	GLUT1	-	++
	GLUT4	-	-
<i>Δhxt Δerg4</i>	GLUT1	-	(+)
	GLUT4	-	-
<i>Δhxt Δerg5</i>	GLUT1	-	-
	GLUT4	-	-

5

Tabelle 3: Merkmale der hinterlegten Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Nummer der Hinterlegung bei der DSMZ	Genotyp	Phänotyp	Plasmid
DSM 15187	MATa <i>Δhxt1-17 Δgal2</i> <i>Δagt1 Δstl1 Δmph2</i> <i>Δmph3 Δerg4 leu2-3,</i> <i>112 ura3-52 trp1-289</i> <i>his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2</i>	Stamm wächst mit 1% Maltose als C- Quelle; auxotroph für Glukose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil.	-
DSM 15184	MATa <i>Δhxt1-17 Δgal2</i> <i>Δagt1 Δstl1 Δerg4 fgy1-</i>	Stamm wächst mit 1% Maltose als C-	-

	$\Delta agt1 \Delta stl1 \Delta erg4 fgy1-1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-\Delta 1 MAL2-8^c SUC2$	Quelle; auxotroph für Glukose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil.	
DSM 15185	$MATa \Delta hxt1-17 \Delta gal2 \Delta agt1 \Delta stl1 \Delta mph2 \Delta mph3 \Delta erg4 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-\Delta 1 MAL2-8^c SUC2$	Stamm wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glukose, Leucin, Tryptophan und Histidin.	p4H7GLUT4V85M (Selektionsmarker URA3), = Seq ID Nr. 3
DSM 15186	$MATa \Delta hxt1-17 \Delta gal2 \Delta agt1 \Delta stl1 \Delta erg4 fgy1-1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-\Delta 1 MAL2-8^c SUC2$	Stamm wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glukose, Leucin, Tryptophan und Histidin.	p4H7GLUT4V85M (Selektionsmarker URA3) = Seq ID Nr. 3
DSM 15188	$MATa \Delta hxt1-17 \Delta gal2 \Delta agt1 \Delta stl1 \Delta mph2 \Delta mph3 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-\Delta 1 MAL2-8^c SUC2$	Stamm wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glukose, Leucin, Tryptophan und Histidin.	p4H7GLUT4V85M (Selektionsmarker URA3) = Seq ID Nr. 3

Basismedium: 0,67% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (Difco); pH 6,2.

Supplementierung der Auxotrophien: Leucin (0,44 mM), Tryptophan (0,19 mM), Histidin (0,25 mM), Uracil (0,44 mM). Maltose kann zwischen 1-2% eingesetzt

5 werden.

Patentansprüche

- 5 1. Gereinigtes und isoliertes Polynukleotid umfassend eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein GLUT4V85M kodiert.
2. Polynukleotid nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass dieses Polynukleotid eine Sequenz aus einer der folgenden Gruppen umfasst:
- 10 a) eine Nukleotidsequenz gemäß Seq ID Nr. 1
b) eine Nukleotidsequenz, welche unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz der Seq ID Nr. 1 hybridisiert und die für ein Protein GLUT4V85M kodiert.
- 15 3. Polynukleotid nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein GLUT4V85M eine Aminosäuresequenz gemäß Seq ID Nr. 2 aufweist.
4. Polynukleotid nach Anspruch 1 bis 3, in welchem der kodierende Bereich für das Protein GLUT4V85M in operativer Weise mit einem Promotor verbunden ist.
- 20 5. Polynukleotid nach Anspruch 1 bis 4, welches in einer Hefezelle zur Replikation gebracht werden kann.
6. Polynukleotid nach Anspruch 5, mittels dessen in einer Hefezelle ein Protein
- 25 zur Ausprägung gebracht werden kann.
7. Hefezelle aus *Saccharomyces cerevisiae*, dadurch gekennzeichnet, dass sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind und kein funktionelles Erg4 Protein enthalten ist.
- 30 8. Hefezelle aus *Saccharomyces cerevisiae*, dadurch gekennzeichnet, dass sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind, kein funktionelles Fgy1 Protein enthalten ist und kein funktionelles Erg4 Protein enthalten ist.

9. Hefezelle nach Anspruch 7 oder 8 gekennzeichnet dadurch, dass das *ERG4*-Gen ganz oder teilweise deletiert ist.

10. Hefezelle nach Anspruch 7 wie hinterlegt als *Saccharomyces cerevisiae*
5 DSM 15187.

11. Hefezelle nach Anspruch 8 oder 9 wie hinterlegt als *Saccharomyces cerevisiae*
DSM 15184.

10 12. Verwendung einer Hefezelle gemäß Anspruch 15 bis 18 zur Ausprägung eines
GLUT1 Proteins oder GLUT4 Proteins eines Säugetieres.

13. Verwendung nach Anspruch 12 zur Ausprägung eines menschlichen GLUT4
Proteins oder eines menschlichen GLUT1 Proteins.

15

14. Hefezelle gemäß Anspruch 7 enthaltend ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1
bis 6.

15. Hefezelle gemäß Anspruch 14 enthaltend ein Protein GLUT4V85M.

20

16. Hefezelle nach Anspruch 14 und/oder 15 wie hinterlegt als *Saccharomyces*
cerevisiae DSM 15185.

25

17. Herstellung einer Hefezelle gemäß Anspruch 14 bis 16 gekennzeichnet
dadurch, dass

- a) eine Hefezelle gemäß Anspruch 7 bereitgestellt wird,
- b) ein Polynukleotid gemäß Anspruch 5 oder 6 bereitgestellt wird,
- c) die Hefezelle gemäß a) mit dem Polynukleotid gemäß b) transformiert wird,
- d) eine transformierte Hefezelle selektiert wird,
- e) gegebenenfalls ein Protein GLUT4V85M zur Expression gebracht wird.

30

18. Hefezelle gemäß Anspruch 8 oder 9 enthaltend ein Polynukleotid gemäß
Anspruch 1 bis 6.

19. Hefezelle nach Anspruch 18 enthaltend ein Protein GLUT4V85M.

20. Hefezelle nach Anspruch 18 und/oder 19 wie hinterlegt als *Saccharomyces cerevisiae* DSM 15186.

5

21. -Herstellung einer Hefezelle gemäß Anspruch 18 bis 20 dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle gemäß Anspruch 8 oder 9 bereitgestellt wird,
- b) ein Polynukleotid gemäß Anspruch 5 oder 6 bereitgestellt wird,
- 10 c) die Hefezelle gemäß a) mit dem Polynukleotid gemäß b) transformiert wird,
- d) eine transformierte Hefezelle selektiert wird,
- e) gegebenenfalls ein Protein GLUT4V85M zur Expression gebracht wird.

15

22. Hefezelle, deren sämtliche Glukosetransporter nicht mehr funktionell sind enthaltend ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 bis 6.

23. Hefezelle gemäß 22 enthaltend ein Protein GLUT4V85M.

20

24. Hefezelle nach Anspruch 22 und/oder 23 wie hinterlegt als *Saccharomyces cerevisiae* DSM 15188.

25. Herstellung einer Hefezelle gemäß Anspruch 22 bis 24 dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle hergestellt wird, deren sämtliche Glukosetransporter nicht
- 25 mehr funktionell sind,
- b) ein Polynukleotid gemäß Anspruch 5 oder 6 bereitgestellt wird,
- c) die Hefezelle gemäß a) mit dem Polynukleotid gemäß b) transformiert wird,
- d) eine transformierte Hefezelle selektiert wird,
- e) gegebenenfalls ein Protein GLUT4V85M zur Expression gebracht wird.

30

26. Protein mit der funktionellen Aktivität eines Glukosetransporters gekennzeichnet dadurch, dass es durch eine Polynukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert ist.

27. Protein nach Anspruch 13 bestehend aus einer Aminosäuresequenz gemäß Seq. ID Nr. 2.

28. Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Aktivität eines

5 GLUT4 Proteins stimuliert, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle gemäß einem oder mehrerer der Ansprüche 14 bis 17 bereitgestellt wird,
- b) eine chemische Verbindung bereitgestellt wird,
- c) die Hefe aus a) mit der chemischen Verbindung aus b) in Kontakt gebracht
- 10 wird,
- d) die Glukoseaufnahme der Hefe aus c) festgestellt wird,
- e) der festgestellte Wert der Glukoseaufnahme aus d) in Beziehung gesetzt wird zum festgestellten Wert der Glukoseaufnahme in einer Hefezelle gemäß a),
- 15 welche nicht mit einer chemischen Verbindung gemäß b) in Kontakt gebracht wird, wobei eine Verbindung, die eine Vergrößerung der aufgenommenen Glukosemenge in der Hefe gemäß d) bewirkt, die Aktivität des GLUT4 Proteins stimuliert.

29. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, dadurch gekennzeichnet, dass sie

20 mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 28 identifiziert werden, sowie Zusatz- und Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels.

30. Verwendung einer Verbindung, welche mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 28 identifiziert wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung

25 von Diabetes Typ I und/oder II.

31. Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche das korrespondierende Protein des Fgy1 Gens inhibiert, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle gemäß einem oder mehrerer der Ansprüche 7 oder 10, welche
- 30 ein GLUT4 Protein enthält, bereitgestellt wird,
- b) eine chemische Verbindung bereitgestellt wird,
- c) die Hefe aus a) mit der chemischen Verbindung aus b) in Kontakt gebracht wird,
- d) die Glukoseaufnahme der Hefe aus c) festgestellt wird,

e) der festgestellte Wert der Glukoseaufnahme aus d) in Beziehung gesetzt zum festgestellten Wert der Glukoseaufnahme in einer Hefezelle gemäß a), welche nicht mit einer chemischen Verbindung gemäß b) in Kontakt gebracht wurde, wobei eine Verbindung, die eine Erhöhung der aufgenommenen Menge an Glukose in der Hefe gemäß d) bewirkt, die Aktivität eines Proteins Fgy1 inhibiert.

32. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, dadurch gekennzeichnet, dass sie mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 31 identifiziert wurde, sowie Zusatz- und Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels.

33. Verwendung einer Verbindung, welche mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 31 identifiziert wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes.

34. Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche das Protein, welches durch das ERG4 Gen kodiert ist, inhibiert, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) eine Hefezelle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 25 bereitgestellt wird,
- b) eine chemische Verbindung bereitgestellt wird,
- c) die Hefe aus a) mit der chemischen Verbindung aus b) in Kontakt gebracht wird,
- d) die Glukoseaufnahme der Hefe aus c) festgestellt wird,
- e) der festgestellte Wert der Glukoseaufnahme aus d) in Beziehung gesetzt wird zum festgestellten Wert der Glukoseaufnahme in einer Hefezelle gemäß a), welche nicht mit einer chemischen Verbindung gemäß b) in Kontakt gebracht wurde, wobei eine Verbindung, die eine Erhöhung der aufgenommenen Menge an Glukose in der Hefe gemäß d) bewirkt, die Aktivität des Proteins Erg4 inhibiert.

35. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, dadurch gekennzeichnet, dass sie mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 34 identifiziert wurde, sowie Zusatz- und Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels.

36. Verwendung einer Verbindung, welche mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 34 identifiziert wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes.

5

10



15

20



25

30

Zusammenfassung:

- 5 Die Erfindung bezieht sich auf Hefestämme, in denen ein humaner GLUT4 Transporter oder ein humaner GLUT1 Transporter funktional zur Expression gebracht werden kann sowie auf bestimmte GLUT4 Transportproteine, die in Hefestämmen besonders einfach funktional exprimiert werden können.

10



15

20



25

30

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* Erg4 zur
Expression von Glukosetransportern aus Säugetieren

<130> NAE-004400

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1530

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

atgccgtcgg gcttccaaca gataggctcc gaagatgggg aacccccctca gcagcgagtg 60
actgggaccc tggtccttgc tgtgttctct gcggtgcttg gctccctgca gtttgggtac 120
aacattgggg tcatcaatgc ccctcagaag gtgattgaac agagctacaa tgagacgttg 180
ctggggaggc aggggcctga gggaccacgc tccatccctc caggcaccct caccaccctc 240
tgggcccctc ccatggccat cttttccgtg ggcggcatga tttcctcctt cctcattggt 300
atcatctctc agtggcttgg aaggaaaagg gccatgcttg tcaacaatgt cctggcggtg 360
ctggggggca gcctcatggg cctggccaac gctgctgcct cctatgaaat gctcatcctt 420
ggacgattcc tcattggcgc ctactcaggg ctgacatcag ggctggtgcc catgtacgtg 480
ggggagattg ctcccactca cctgcggggc gccctgggga cgctcaacca actggccatt 540
gttatcggca ttctgatcgc ccagggtgctg ggcttggagt ccctcctggg cactgccagc 600
ctgtggccac tgctcctggg cctcacagtg ctacctgcc tctgcagct ggtcctgctg 660
cccttctgtc ccgagagccc ccgtacctc tacatcatcc agaatctcga ggggcctgcc 720
agaaagagtc tgaagcgcct gacaggctgg gccgatgttt ctggagtgtt ggctgagctg 780
aaggatgaga agcggaagct ggagcgtgag cggccactgt ccctgctcca gctcctgggc 840
agccgtaccc accggcagcc cctgatcatt gcggtcgtgc tgcagctgag ccagcagctc 900
tctggcatca atgctgtttt ctattattcg accagcatct tcgagacagc aggggtaggc 960
cagcctgcct atgccacatc aggagctggt gtggtcaaca cagtcttcac cttggtctcg 1020
gtgttgttgg tggagcgggc ggggcgccgg acgctccatc tcctgggcct ggcgggcatg 1080
tgtggctgtg ccatectgat gactgtgget ctgctcctgc tggagcgagt tccagccatg 1140
agctacgtct ccattgtggc catctttggc ttcgtggcat tttttgagat tggccctggc 1200
cccattcctt ggttcacgtt ggccgagctc ttcagccagg gaccccgccc ggcagccatg 1260
gctgtggctg gtttctccaa ctggacgagc aacttcatca ttggcatggg tttccagtat 1320
gttgccgagg ctatggggcc ctacgtcttc cttctatttg cggtcctcct gctgggcttc 1380
ttcatcttca cttctttaag agtacctgaa actcgaggcc ggacgtttga ccagatctca 1440
gctgccttcc accggacacc ctctctttta gacgaggagg tgaaaccag cacagaactt 1500
gagtatttag ggccagatga gaacgactga
1530

```

<210> 2
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Pro Ser Gly Phe Gln Gln Ile Gly Ser Glu Asp Gly Glu Pro Pro
1 5 10 15
Gln Gln Arg Val Thr Gly Thr Leu Val Leu Ala Val Phe Ser Ala Val
20 25 30
Leu Gly Ser Leu Gln Phe Gly Tyr Asn Ile Gly Val Ile Asn Ala Pro
35 40 45
Gln Lys Val Ile Glu Gln Ser Tyr Asn Glu Thr Trp Leu Gly Arg Gln
50 55 60
Gly Pro Glu Gly Pro Ser Ser Ile Pro Pro Gly Thr Leu Thr Thr Leu
65 70 75 80
Trp Ala Leu Ser Met Ala Ile Phe Ser Val Gly Gly Met Ile Ser Ser
85 90 95
Phe Leu Ile Gly Ile Ile Ser Gln Trp Leu Gly Arg Lys Arg Ala Met
100 105 110
Leu Val Asn Asn Val Leu Ala Val Leu Gly Gly Ser Leu Met Gly Leu
115 120 125
Ala Asn Ala Ala Ala Ser Tyr Glu Met Leu Ile Leu Gly Arg Phe Leu
130 135 140
Ile Gly Ala Tyr Ser Gly Leu Thr Ser Gly Leu Val Pro Met Tyr Val
145 150 155 160
Gly Glu Ile Ala Pro Thr His Leu Arg Gly Ala Leu Gly Thr Leu Asn
165 170 175
Gln Leu Ala Ile Val Ile Gly Ile Leu Ile Ala Gln Val Leu Gly Leu
180 185 190
Glu Ser Leu Leu Gly Thr Ala Ser Leu Trp Pro Leu Leu Leu Gly Leu
195 200 205
Thr Val Leu Pro Ala Leu Leu Gln Leu Val Leu Leu Pro Phe Cys Pro

210	215	220
Glu Ser Pro Arg Tyr Leu Tyr Ile Ile Gln Asn Leu Glu Gly Pro Ala		
225	230	235 240
Arg Lys Ser Leu Lys Arg Leu Thr Gly Trp Ala Asp Val Ser Gly Val		
245	250	255
Leu Ala Glu Leu Lys Asp Glu Lys Arg Lys Leu Glu Arg Glu Arg Pro		
260	265	270
Leu Ser Leu Leu Gln Leu Leu Gly Ser Arg Thr His Arg Gln Pro Leu		
275	280	285
Ile Ile Ala Val Val Leu Gln Leu Ser Gln Gln Leu Ser Gly Ile Asn		
290	295	300
Ala Val Phe Tyr Tyr Ser Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ala Gly Val Gly		
305	310	315 320
Gln Pro Ala Tyr Ala Thr Ile Gly Ala Gly Val Val Asn Thr Val Phe		
325	330	335
Thr Leu Val Ser Val Leu Leu Val Glu Arg Ala Gly Arg Arg Thr Leu		
340	345	350
His Leu Leu Gly Leu Ala Gly Met Cys Gly Cys Ala Ile Leu Met Thr		
355	360	365
Val Ala Leu Leu Leu Leu Glu Arg Val Pro Ala Met Ser Tyr Val Ser		
370	375	380
Ile Val Ala Ile Phe Gly Phe Val Ala Phe Phe Glu Ile Gly Pro Gly		
385	390	395 400
Pro Ile Pro Trp Phe Ile Val Ala Glu Leu Phe Ser Gln Gly Pro Arg		
405	410	415
Pro Ala Ala Met Ala Val Ala Gly Phe Ser Asn Trp Thr Ser Asn Phe		
420	425	430
Ile Ile Gly Met Gly Phe Gln Tyr Val Ala Glu Ala Met Gly Pro Tyr		
435	440	445
Val Phe Leu Leu Phe Ala Val Leu Leu Leu Gly Phe Phe Ile Phe Thr		
450	455	460
Phe Leu Arg Val Pro Glu Thr Arg Gly Arg Thr Phe Asp Gln Ile Ser		

465

470

475

480

Ala Ala Phe His Arg Thr Pro Ser Leu Leu Glu Gln Glu Val Lys Pro

485

490

495

Ser Thr Glu Leu Glu Tyr Leu Gly Pro Asp Glu Asn Asp

500

505

<210> 3

<211> 7809

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

cgtaggaaca atttcgggcc cctgcgtggt cttctgaggt tcatctttta catttgcttc 60
 tgctggataa ttttcagagg caacaaggaa aaattagatg gcaaaaagtc gtctttcaag 120
 gaaaaatccc caccatcttt cgagatcccc tgtaacttat tggcaactga aagaatgaaa 180
 aggaggaaaa taaaaaatat actagaactg aaaaaaaaaa agtataaata gagacgatat 240
 atgccaatac ttcacaatgt tcgaatctat tcttcatttg cagctattgt aaaataataa 300
 aacatcaaga acaacaagc tcaacttgct ttttctaaga acaagaata aacacaaaaa 360
 caaaaagttt ttttaatttt aatcaaaaaa tgccgctcggg cttccaacag ataggctccg 420
 aagatgggga accccctcag cagcgagtga ctgggaccct ggtccttgct gtgttctctg 480
 cgggtgcttg ctccctgcag tttgggtaca acattggggg catcaatgcc cctcagaagg 540
 tgattgaaca gagctacaat gagacgtggc tggggaggca ggggcctgag ggaccagct 600
 ccatccctcc aggcaccctc accaccctct gggccctctc catggccatc ttttcctggtg 660
 ggggcatgat ttctctcttc ctcatgggta tcatctctca gtggccttggg aggaaaaggg 720
 ccatgctggt caacaatgtc ctggcggtgc tggggggcag cctcatgggc ctggccaacg 780
 ctgctgcctc ctatgaaatg ctcatccttg gacgattcct cattggcgcc tactcagggc 840
 tgacatcagg gctggtgccc atgtacgtgg gggagattgc tccactcac ctgcgggggc 900
 ccctggggac gctcaaccaa ctggccattg ttatcggcac tctgatcgcc cagggtgctgg 960
 gcttggagtc cctcctgggc actgccagcc tgtggccact gctcctgggc ctcacagtgc 1020
 tacctgcctc cctgcagctg gtctgctgc ccttctgtcc cgagagcccc cgctacctct 1080
 acatcatcca gaatctcgag gggcctgcca gaaagagtct gaagcgctg acaggctggg 1140
 ccgatgtttc tggagtgtg gctgagctga aggatgagaa gcggaagctg gagcgtgagc 1200
 ggccactgtc cctgctccag ctctgggca gccgtacca ccggcagccc ctgatcattg 1260
 cggctcgtgct gcagctgagc cagcagctct ctggcatcaa tgctgttttc tattattcga 1320
 ccagcatctt cgagacagca ggggtaggcc agcctgccta tgccaccata ggagctggtg 1380
 tggtaaacac agtcttcacc ttggtctcgg tgttgttggt ggagcgggcg gggcgccgga 1440
 cgctccatct cctgggcctg gcgggcatgt gtggctgtgc catcctgatg actgtggctc 1500
 tgctcctgct ggagcgagtt ccagccatga gctacgtctc cattgtggcc atctttggct 1560
 tcgtggcatt ttttgagatt ggccctggcc ccattccttg gttcatcgtg gccgagctct 1620
 tcagccaggg accccgcccg gcagccatgg ctgtggctgg tttctccaac tggacgagca 1680
 acttcatcat tggcatgggt ttccagtatg ttgcggaggc tatggggccc tacgtcttcc 1740
 ttctatttgc ggtcctcctg ctgggcttct tcatcttcac cttcttaaga gtacctgaaa 1800
 ctcgaggccg gacgtttgac cagatctcag ctgccttcca ccggacaccc tctcttttag 1860
 agcaggaggt gaaaccacgc acagaacttg agtatttagg gccagatgag aacgactgac 1920

tcgagtcacg	taattagtta	tgtcacgctt	acattcacgc	cctcccccca	catccgctct	1980
aaccgaaaag	gaaggagtta	gacaacctga	agtctaggtc	cctattttatt	tttttatagt	2040
tatgttagta	ttaagaacgt	tatttatatt	tcaaattttt	cttttttttc	tgtacagacg	2100
cgtgtacgca	tgtaacatta	tactgaaaac	cttgcttgag	aaggttttgg	gacgctcgaa	2160
ggctttaatt	tgcgcccggt	acccaattcg	ccctatagtg	agtcgtatta	cgcgcgctca	2220
ctggccgctg	ttttacaacg	tcgtgactgg	gaaaaccctg	gcgttaccca	acttaatcgc	2280
cttgacgac	atcccccttt	cgccagctgg	cgtaatagcg	aagaggcccc	caccgatcgc	2340
ccttcccaac	agttgcgcag	cctgaatggc	gaatggcgcg	acgcgccttg	tagcggcgca	2400
ttaagcgcg	cggtgtgtgt	ggttacgcgc	agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgcccta	2460
gcgcccgcgc	ctttcgcttt	cttcccttcc	tttctcgcca	cgttcgccgg	ctttccccgt	2520
caagctctaa	atcggggggt	cccttttaggg	ttccgattta	gtgctttacg	gcacctcgac	2580
cccaaaaaac	ttgattaggg	tgatgggttca	cgtagtgggc	catcgccctg	atagacgggt	2640
tttcgcccct	tgacgttgga	gtccacgttc	tttaatagtg	gactcttggt	ccaaactgga	2700
acaacactca	accctatctc	ggcttattct	tttgatttat	aagggttttt	gccgatttcg	2760
gcctattggg	taaaaaatga	gctgatttaa	caaaaattta	acgcgaattt	taacaaaata	2820
ttaacgttta	caatttcctg	atgcgggtatt	ttctccttac	gcatctgtgc	gggtatttcac	2880
accgcatagg	gtaataactg	atataattaa	attgaagctc	taatttgtga	gtttagtata	2940
catgcattta	cttataatac	agtttttttag	ttttgtggc	cgcatcttct	caaatatgct	3000
tcccagcctg	cttttctgta	acgttcaccc	tctaccttag	catcccttcc	ctttgcaaat	3060
agtcctcttc	caacaataat	aatgtcagat	cctgtagaga	ccacatcatc	cacggttcta	3120
tactgttgac	ccaatgcgtc	tcccttgtca	tctaaacca	caccgggtgt	cataatcaac	3180
caatcgtaac	cttcatctct	tccacccatg	tctctttgag	caataaagcc	gataacaaaa	3240
tctttgtcgc	tcttcgcaat	gtcaacagta	cccttagtat	attctccagt	agatagggag	3300
cccttgcatg	acaattctgc	taacatcaaa	aggcctctag	gttcctttgt	tacttcttct	3360
gcgcgcctgt	tcaaaccgct	aacaatacct	gggccacca	caccgtgtgc	attcgtaatg	3420
tctgcccatt	ctgctattct	gtatacaccc	gcagagtact	gcaatttgac	tgtattacca	3480
atgtcagcaa	attttctgtc	ttcgaagagt	aaaaaattgt	acttgccgga	taatgccttt	3540
agcggcttaa	ctgtgccttc	catggaaaaa	tcagtcaaga	tatccacatg	tgtttttagt	3600
aaacaaaatt	tgggacctaa	tgcttcaact	aaactccagta	attccttggt	ggtagcaaca	3660
tccaatgaag	cacacaagtt	tgtttgcttt	tcgtgcatga	tattaaatag	cttggcagca	3720
acaggactag	gatgagtagc	agcacgttcc	ttatatgtag	ctttcgacat	gatttatctt	3780
cgtttcctgc	aggtttttgt	tctgtgcagt	tgggttaaga	atactgggca	atttcatgtt	3840
tcttcaacac	tacatatgcg	tatatatacc	aatctaagtc	tgtgctcctt	ccttcgttct	3900
tccttctgtt	cggagattac	cgaatcaaaa	aaatttcaaa	gaaaccgaaa	tcaaaaaaaaa	3960
gaataaaaaa	aaaatgatga	attgaattga	aaagctgtgg	tatggtgcac	tctcagtaca	4020
atctgctctg	atgccgcata	gttaagccag	ccccgacacc	cgccaacacc	cgctgacgcg	4080
ccctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	gcttacagac	aagctgtgac	cgtctccggg	4140
agctgcatgt	gtcagagggt	ttcacctgca	tcaccgaaac	gcgcgagacg	aaagggcctc	4200
gtgatacgcc	tatttttata	ggttaatgtc	atgataataa	tggtttttta	gtatgatcca	4260
atatcaaagg	aaatgatagc	attgaaggat	gagactaatc	caattgagga	gtggcagcat	4320
atagaacagc	taaagggtag	tgctgaagga	agcatacgat	accccgcatg	gaatgggata	4380
atatcacagg	aggtagtaga	ctacctttca	tcctacataa	atagacgcat	ataagtacgc	4440
atttaagcat	aaacacgcac	tatgccgttc	ttctcatgta	tatatatata	caggcaacac	4500
gcagatatag	gtgcgacgtg	aacagtgagc	tgatgtgcg	cagctcgctg	tgcattttcg	4560
gaagcgctcg	ttttcgga	cgctttgaag	ttcctattcc	gaagttccta	ttctctagaa	4620
agtataggaa	cttcagagcg	cttttgaaaa	ccaaaagcgc	tctgaagacg	cactttcaaa	4680
aaacaaaaaa	cgcaccggac	tgtaacgagc	tactaaaata	ttgcgaatac	cgcttcacac	4740
aacattgctc	aaaagtatct	ctttgctata	tatctctgtg	ctatatccct	atataaccta	4800

cccatccacc tttcgcctcct tgaacttgca tctaaactcg acctctacat tttttatggt 4860
 tatctctagt attactcttt agacaaaaaa attgtagtaa gaactattca tagagtgaat 4920
 cgaaaacaat acgaaaatgt aaacatttcc tatacgtagt atatagagac aaaatagaag 4980
 aaaccgttca taattttctg accaatgaag aatcatcaac gctatcactt tctgttcaca 5040
 aagtatgctc aatccacatc ggtatagaat ataatcgggg atgcctttat cttgaaaaaa 5100
 tgcacccgca gcttcgctag taatcagtaa acgcgggaag tggagtcagg ctttttttat 5160
 ggaagagaaa atagacacca aagtagcctt cttctaacct taacggacct acagtgcaaa 5220
 aagttatcaa gagactgcat tatagagcgc acaaaggaga aaaaaagtaa tctaagatgc 5280
 tttgttagaa aaatagcgtc ctcgggatgc atttttgtag aacaaaaaag aagtatagat 5340
 tctttgttgg taaaatagcg ctctcgcgtt gcatttctgt tctgtaaaaa tgcagctcag 5400
 attctttgtt tgaaaaatta gcgctctcgc gttgcatttt tgttttacia aaatgaagca 5460
 cagattcttc gttggtaaaa tagcgttttc gcgttgcat tctgttctgt aaaaatgcag 5520
 ctcagattct ttgtttgaaa aattagcgtc ctcgcgttgc atttttgttc tacaaaaatga 5580
 agcacagatg cttcgttcag gtggcacttt tcgggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 5640
 tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 5700
 gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat 5760
 tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tgggtgaaagt 5820
 aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 5880
 cggtaaagatc cttgagagtt ttgcgccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa 5940
 agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 6000
 ccgcatacac tattctcaga atgacttgggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 6060
 tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac 6120
 tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca 6180
 caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat 6240
 accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact 6300
 attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc 6360
 ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctgggt ttattgctga 6420
 taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg 6480
 taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg 6540
 aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca 6600
 agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 6660
 ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca 6720
 ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 6780
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 6840
 tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 6900
 tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 6960
 tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 7020
 tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 7080
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 7140
 acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggatatcc 7200
 ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg 7260
 gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 7320
 ctcgctcagg gggcgagacc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 7380
 ggctttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttctcgcg ttatcccttg attctgtgga 7440
 taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg 7500
 cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgccccata cgcaaaccgc ctctccccgc 7560
 gcgttgggcg attcattaat gcagctggca cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag 7620
 tgagcgcaac gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccgag ctttacactt 7680

tatgcttccg gctcctatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa 7740
cagctatgac catgattacg ccaagcgcg c aattaaccct cactaaaggg aacaaaagct 7800
ggagctttt 7809



INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSMdef	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15184
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde (X) eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-09-03 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: Datum: 2002-09-10

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Aventis Pharma Deutschland GmbH Anschrift: Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15184 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2002-09-03	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2002-09-06 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST⁴			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Weitz</i> Datum: 2002-09-10	

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSMefg	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15185
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde (x) eine wissenschaftliche Beschreibung (x) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-09-03 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: Datum: 2002-09-10

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Aventis Pharma Deutschland GmbH Anschrift: Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15185 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2002-09-03	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2002-09-06 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ¹ lebensfähig () ¹ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST⁴			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: V. Weh Datum: 2002-09-10	

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSMhij	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15186
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-09-03 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: Datum: 2002-09-10

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Aventis Pharma Deutschland GmbH Anschrift: Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 15186 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2002-09-03
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2002-09-06 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (x) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: U. We. 20 Datum: 2002-09-10

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

DSMZ
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

Aventis Pharma Deutschland GmbH
Industriepark Höchst
D-65926 Frankfurt

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSM ₅ yz	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15187
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(x) eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>(x) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-09-03 (Datum der Erst- hinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wehr</i></p> <p>Datum: 2002-09-10</p>

Formblatt DSMZ-BP/4 (einzige Seite) 12/2001

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Aventis Pharma Deutschland GmbH Anschrift: Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15187 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2002-09-03	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2002-09-06 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (x) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST⁴			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: V. Weitz Datum: 2002-09-10	

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.


INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSMuvw	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15188
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-09-03 (Datum der Erst- hinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2002-09-10


¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma Deutschland GmbH
Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Aventis Pharma Deutschland GmbH Anschrift: Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15188 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2002-09-03	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2002-09-06 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (x) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST²			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2002-09-10	

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.